

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103667420 A

(43) 申请公布日 2014.03.26

(21) 申请号 201310611605.X

(22) 申请日 2013.11.28

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 梁伟 董文娟 张春玲 魏秀莉
黄峰

(51) Int. Cl.

C12Q 1/48 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

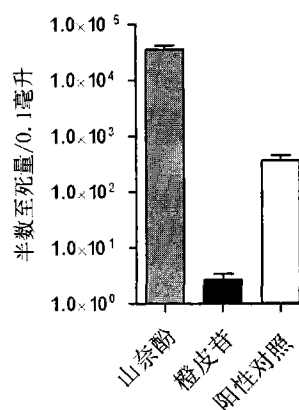
权利要求书1页 说明书9页 附图6页

(54) 发明名称

一种以 MAPK 家族蛋白为靶标筛选调节病毒活性化合物的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种以 MAPK 家族特定的三个蛋白 (P38、JNK、ERK) 为靶标筛选抗病毒化合物的方法, 以及由该方法筛选获得的黄酮母核类化合物, 还涉及由该筛选方法筛选获得的特定化合物在调节 MAPK 家族蛋白表达活性中的应用, 以及所述化合物在激活机体细胞自体防御功能中的应用。



1. 一种以 MAPK 蛋白家族成员为靶标筛选调节病毒活性的小分子化合物的方法,所述的 MAPK 蛋白家族成员为 p38 (protein38)、JNK (JUN N-terminal kinase)、ERK (extracellular-signal-regulated kinase) 蛋白或其磷酸化形式。

2. 权利要求 1 所述的筛选方法,其特征在于,所述的病毒优选为 RNA 病毒,更优选为流感病毒,最优选为流感病毒 H1N1 株系。

3. 权利要求 1 或 2 所述的筛选方法,其特征在于,所述方法为检测目标小分子对所述的 MAPK 蛋白家族成员的表达量或功能的调控效果,若,

①所述目标小分子上调 p38、JNK 蛋白或其磷酸化形式,或下调 ERK 蛋白或其磷酸化形式的表达量或功能时,则判定该化合物具有抑制病毒活性的功能;

②所述目标小分子下调 p38、JNK 蛋白或其磷酸化形式,或上调 ERK 蛋白或其磷酸化形式的表达量或功能时,则判定该化合物具有增强病毒活性的功能。

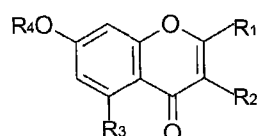
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的筛选方法,其特征在于,所述方法为检测目标小分子对所述的 MAPK 蛋白家族成员的表达量或功能的调控效果,若,

①所述目标小分子上调 p38、JNK 蛋白或其磷酸化形式,且同时下调 ERK 蛋白或其磷酸化形式的表达量或功能时,则判定该化合物具有抑制病毒活性的功能,

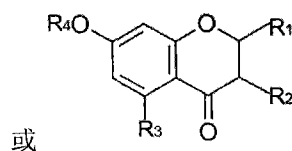
②所述目标小分子下调 p38、JNK 蛋白或其磷酸化形式,且同时上调 ERK 蛋白或其磷酸化形式的表达量或功能时,则判定该化合物具有增强病毒活性的功能。

5. 权利要求 1-4 所述方法筛选获得的具有调节病毒活性的小分子化合物,其特征在于,所述小分子化合物不是已知结构的黄酮类天然小分子化合物。

6. 根据权利要求 5 所述的小分子化合物,其特征在于,所述的小分子化合物的结构通式为:



其中, R1 为 H 或苯基、邻甲氧苯酚基、对苯甲醚基、邻二苯甲醚基、对苯酚基取代基, R2 为 H 或 OR4 或苯基、邻甲氧苯酚基、对苯甲醚基、邻二苯甲醚基、对苯酚基、多元环糖及其寡聚物取代基, R3 为羟基或 H, R4 为 H 或多元环糖及其寡聚物取代基,



其中, R1 为苯基、邻甲氧苯酚基、对苯甲醚基、邻二苯甲醚基、对苯酚基取代基, R2 为 H, R3 为羟基, R4 为 H 或多元环糖及其寡聚物取代基。

7. 权利要求 1-4 所述方法筛选获得的小分子化合物在制备同时调节 MAPK 家族中多个蛋白的功能的制剂中的应用。

8. 权利要求 1-4 所述方法筛选获得的小分子化合物在制备激活细胞自体防御功能的药物中的应用。

一种以 MAPK 家族蛋白为靶标筛选调节病毒活性化合物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种特定多蛋白靶点的抗病毒小分子化合物的筛选方法,由此获得的化合物及其抗病毒应用。

背景技术

[0002] 流感是一个全球性的人畜共患的由流感病毒引起的季节性爆发的呼吸系统疾病,全球范围内每年大约有 20% 的人被流感病毒感染。虽然现有的药物和疫苗对于流感病毒的传播和疾病的控制能起到一定的作用,但是其效果相当有限,原因之一是因为大多数药物仅针对某些特定的病毒蛋白靶点,而 RNA 病毒的基因组高突变率,进而导致病毒耐药性的产生和宿主免疫系统的逃逸效果,更进一步的,流感病毒的基因组仅由八个 RNA 片段编码了所有的 11 个蛋白 (HA, NA, NP, NS1, NS2, PA, M1, M2, PB1-F2, PB1 and PB2),也限制了抗病毒药物的靶标数量。

[0003] 另一方面,虽然不同致病强度流感病毒的感染使宿主产生不同强度的免疫应答,但是多数流感病毒毒株如 H1N1, H3N2, H5N1 和 H7N9 亚型,在进化过程中产生了相似的抑制宿主免疫应答的能力,即在流感病毒感染宿主初期,宿主体内免疫反应被抑制,待到感染后期,病毒已经大量复制和扩散,突然爆发大规模免疫反应,使得机体严重受损如病毒性肺炎。

[0004] 目前,不同于传统的仅以病毒基因组为靶标开发抗病毒药物的策略,一些较为新颖的抗流感药物开发策略开始着眼于不同的角度,例如通过调节特定的病毒生命周期所需要细胞因子,或是通过激活宿主细胞的抗病毒反应等,这些新的策略已被证明具有相当的优势。宿主的抗病毒效应不止体现在免疫系统的激活,更表现为细胞的自体防御功能(也被称为细胞自主免疫),在所有的生物体中,这一功能都用来保护宿主对抗病原微生物。不像免疫细胞的特异性抗病毒功能,细胞自主免疫在大部分细胞系中都有存在,表现为宿主的第一层防御机制。在免疫系统被激活且免疫细胞募集至感染点前,某些体细胞例如上皮细胞已经开始通过一定步骤对不同病毒周期进行抑制(包括侵入、脱壳、复制和释放等),并通过一些由宿主释放的信号(例如宿主防御因子和分泌型细胞因子和趋化因子,如干扰素)抑制病毒的扩散,这一过程有效的抑制了病毒的复制和传播,同时也减少了组织损伤。

[0005] 在细胞自体防御调控机制的分子生物学途径中,MAPK 通路是重要的信号转导通路,该通路通过将细胞外刺激转化为细胞内信号来调控多种细胞内生理生化活动,特别是细胞的自体免疫应答。MAPK 家族包括三个成员,分别为 JUN-N 末端激酶 (JNK), p38 激酶 (p38) 和胞外信号调节激酶 (ERK)。

[0006] 在流感病毒感染的细胞模型中,目前已有文献报道,JNK 和 p38 蛋白通过调控转录因子 ATF-2 和 c-Jun 的表达,参与调控干扰素 β , 干扰素 γ 和其他抗病毒细胞因子的表达,继而调控宿主对流感病毒感染的免疫反应。已有报道表明,增加 JNK 和 p38 激酶表达,不但增强宿主上皮细胞抗病毒细胞因子的表达,同时通过增强宿主免疫细胞如巨噬细胞和树突

状细胞的活化和募集,即增强宿主天然免疫和获得性免疫反应。

[0007] 另一方面, ERK 则参与调控病毒核糖核蛋白复合体出核过程, 已有文献报道表明, 多数流感病毒毒株如 H1N1, H3N2, H5N1 和 H7N9 亚型的生活周期基本相同, 在病毒复制过程中都需要 ERK 调控其病毒核糖核蛋白复合体出核过程, 因此, 降低的 ERK 表达对流感病毒出核过程具有抑制作用, 从而能够抑制流感病毒的复制。

[0008] 虽然 MAPK 家族通过调控流感病毒自身复制过程和宿主免疫应答过程而影响流感病毒的扩散及对机体的损伤的基础功能都已被阐明。但是, 并未有任何报道表明, 存在某一化合物, 能够同时调控 JNK、p38 和 ERK 的分子效应。而同时, 一般意义的抗感冒病毒药物筛选方案, 也多集中在针对单一靶标蛋白的目标化合物的筛选过程, 因此, 也并没有任何以上述 MAPK 家族中的多个成员的组合效应为调节目标的定点药物筛选方案的报道。

[0009] 下列参考文献作为背景技术的参考, 以其公开的内容引入本申请:

[0010] 1. Huang, Y. T. & Turchek, B. M., Mink lung cells and mixed mink lung and A549 cells for rapid detection of influenza virus and other respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 38, 422-423 (2000).

[0011] 2. Chakrabarti, A. K. et al., Host gene expression profiling in influenza A virus-infected lung epithelial (A549) cells: a comparative analysis between highly pathogenic and modified H5N1 viruses. *Virology* 417, 219 (2010).

[0012] 3. Pauli, E. K. et al., Influenza A virus inhibits type I IFN signaling via NF- κ B-dependent induction of SOCS-3 expression. *PLoS Pathog* 4, e1000196 (2008).

[0013] 4. Karlas, A. et al., Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* 463, 818-822 (2010).

[0014] 5. Ludwig, S., Planz, O., Pleschka, S., & Wolff, T., Influenza-virus-induced signaling cascades: targets for antiviral therapy? *Trends in Molecular Medicine* 9, 46-52 (2003).

[0015] 6. Muller, K. H. et al., Emerging cellular targets for influenza antiviral agents. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 33, 89-99 (2012).

[0016] 7. Randow, F., MacMicking, J. D., & James, L. C., Cellular Self-Defense: How Cell-Autonomous Immunity Protects Against Pathogens. *Science* 340, 701-706 (2013).

[0017] 8. Lee, S. M. Y. & Yen, H. L., Targeting the host or the virus: Current and novel concepts for antiviral approaches against influenza virus infection. *Antiviral Research* 96, 391-404 (2012).

[0018] 9. Ronald, P. C. & Beutler, B., Plant and Animal Sensors of Conserved Microbial Signatures. *Science* 330, 1061-1064 (2010).

[0019] 10. Yan, N. & Chen, Z. J. J., Intrinsic antiviral immunity. *Nature Immunology* 13, 214-222 (2012).

[0020] 11. MacMicking, J. D., Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nature Reviews Immunology* 12, 367-382 (2012).

[0021] 12. Sadler, A. J. & Williams, B. R. G., Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews Immunology* 8, 559-568 (2008).

- [0022] 13. Grandvaux, N., tenOever, B. R., Servant, M. J., & Hiscott, J., The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Current Opinion in Infectious Diseases* 15, 259–267 (2002).
- [0023] 14. Costa-Pereira, A. P. et al., The antiviral response to gamma interferon. *Journal of Virology* 76, 9060–9068 (2002).
- [0024] 15. Randall, R. E. & Goodbonrn, S., Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology* 89, 1–47 (2008).
- [0025] 16. Levy, D. E. & Garcia-Sastre, A., The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 12, 143–156 (2001).
- [0026] 17. Hazzalin, C. A. & Mahadevan, L. C., MAPK-regulated transcription: A continuously variable gene switch? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 30–40 (2002).
- [0027] 18. Stephan Ludwig. Influenza viruses and MAP kinase cascades—Novel targets for an antiviral intervention? *Signal Transduction* 7, 81–88 (2007).
- [0028] 19. Pleschka, S. et al., Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf / MEK / ERK signalling cascade. *Nature Cell Biology* 3, 301–305 (2001).

发明内容

[0029] 正是基于细胞自体防御功能在抗病毒过程中的重要作用,以及 MAPK 家族成员在这一过程中的不同分子效应,本发明人设计了一种以 JNK、p38 和 ERK 分子为靶标的抗病毒药物筛选策略,并以此出发,对相关的小分子化合物进行了功能筛选,进而结合筛选结果的功能验证,证实了这一筛选策略的有效。

[0030] 1、本发明涉及一种以 MAPK 蛋白家族成员为靶标筛选调节病毒活性的小分子化合物的方法,

[0031] 所述的 MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 蛋白家族是 p38 (protein38)、JNK (JUN N-terminal kinase)、ERK (extracellular-signal-regulated kinase) 蛋白或其磷酸化形式;

[0032] 所述的病毒优选为 RNA 病毒,更优选为流感病毒,最优选为流感病毒 H1N1 株系;

[0033] 所述的筛选方法为检测目标小分子对所述的 MAPK 蛋白家族成员的表达量或功能的调控效果,若,

[0034] ①所述目标小分子上调 p38、JNK 蛋白或其磷酸化形式,或下调 ERK 蛋白或其磷酸化形式的表达量或功能时,则判定该化合物具有抗病毒活性;

[0035] ②所述目标小分子下调 p38、JNK 蛋白或其磷酸化形式,或上调 ERK 蛋白或其磷酸化形式的表达量或功能时,则判定该化合物具有增强病毒活性的功能;

[0036] 所述的筛选方法优选为检测目标小分子对 MAPK 蛋白家族成员的表达量或功能的

调控效果,若,

[0037] ①所述目标小分子上调 p38、JNK 蛋白或其磷酸化形式,且同时下调 ERK 蛋白或其磷酸化形式的表达量或功能时,则判定该化合物具有抗病毒活性,

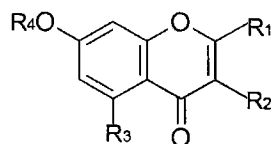
[0038] ②所述目标小分子下调 p38、JNK 蛋白或其磷酸化形式,且同时上调 ERK 蛋白或其磷酸化形式的表达量或功能时,则判定该化合物具有增强病毒活性的功能。

[0039] 所述的小分子化合物包括但不限于,天然小分子化合物、人工合成的小分子化合物,寡肽及其类似物、多糖及其类似物、天然及人工合成的小分子寡聚物,优选为天然存在的黄酮母核的小分子化合物或人工合成的黄酮母核的结构类似物。

[0040] 2、本发明还涉及由所述的筛选方法筛选得到调节病毒活性的小分子化合物,

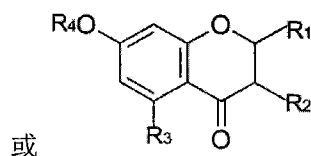
[0041] 所述的小分子化合物的优选结构式为,

[0042]



[0043] 其中, R1 为 H 或苯基、邻甲氧苯酚基、对苯甲醚基、邻二苯甲醚基、对苯酚基取代基, R2 为 H 或 OR4 或苯基、邻甲氧苯酚基、对苯甲醚基、邻二苯甲醚基、对苯酚基、多元环糖及其寡聚物取代基, R3 为羟基或 H, R4 为 H 或多元环糖及其寡聚物取代基,

[0044]



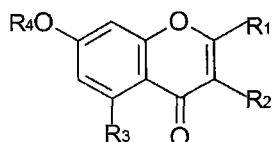
[0045] 其中, R1 为苯基、邻甲氧苯酚基、对苯甲醚基、邻二苯甲醚基、对苯酚基取代基, R2 为 H, R3 为羟基, R4 为 H 或多元环糖及其寡聚物取代基。

[0046] 且不为目前已知结构的黄酮类天然小分子化合物。

[0047] 3、本发明还涉及由所述的筛选方法获得的小分子化合物在制备调节 MAPK 家族蛋白以激活细胞自体防御功能的药物中的应用,

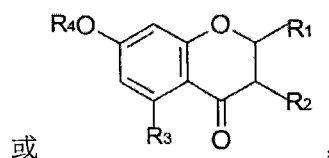
[0048] 所述的小分子化合物的优选结构式为,

[0049]



[0050] 其中, R1 为 H, R2 为苯基、邻甲氧苯酚基、对苯甲醚基、邻二苯甲醚基、对苯酚基、多元环糖及其寡聚物取代基, R3 为羟基或 H, R4 为 H,

[0051]



[0052] 其中, R1 为苯基、邻甲氧苯酚基、对苯甲醚基、邻二苯甲醚基、对苯酚基取代基, R2 为 H, R3 为羟基, R4 为 H 或多元环糖及其寡聚物。

[0053] 所述的小分子化合物最优选为橙皮苷;

[0054] 所述的调节 MAPK 家族蛋白为,

[0055] ①上调 p38、JNK 或其磷酸化形式的表达量或功能、或下调 ERK 蛋白或其磷酸化形式的表达量或功能,

[0056] 或②上调 p38、JNK 或其磷酸化形式的表达量或功能、且同时下调 ERK 蛋白或其磷酸化形式的表达量或功能;

[0057] 所述的药物可以是抗病毒药物, 优选为抗 RNA 病毒药物, 更优选为抗流感病毒药物, 最优选为抗流感病毒 H1N1 株系药物。

[0058] 所述的药物以所述小分子化合物为活性成分, 通过添加本领域技术人员所熟知的常规药用辅料制备而成, 其药物制剂剂型可以是本领域技术人员所熟知的各种制剂剂型。

[0059] 4、本发明还涉及由所述方法筛选获得的小分子化合物在制备同时调节 MAPK 家族中多个蛋白的功能的制剂中的应用,

[0060] 所述的 MAPK 家族蛋白是 p38、JNK、ERK 蛋白;

[0061] 所述的调节 MAPK 家族蛋白的功能是指对所述蛋白的表达量或活性的调节, 优选为,

[0062] ①上调 p38、JNK 或其磷酸化形式的表达量或功能、或下调 ERK 蛋白或其磷酸化形式的表达量或功能,

[0063] 或②下调 p38、JNK 或其磷酸化形式的表达量或功能、或上调 ERK 蛋白或其磷酸化形式的表达量或功能,

[0064] 最优选为,

[0065] ①上调 p38、JNK 或其磷酸化形式的表达量或功能、且同时下调 ERK 蛋白或其磷酸化形式的表达量或功能,

[0066] 或②下调 p38、JNK 或其磷酸化形式的表达量或功能、且同时上调 ERK 蛋白或其磷酸化形式的表达量或功能;

[0067] 所述的制剂以该小分子化合物和本领域技术人员所熟知的辅料制备而成。

附图说明

[0068] 图 1. 橙皮苷和山奈酚对流感病毒的抑制效果 (图 1A. 橙皮苷和山奈酚对流感病毒增殖影响的柱形图、图 1B. 橙皮苷和山奈酚对流感病毒产生细胞病变影响的效应图、图 1C. 橙皮苷和山奈酚分别对猴肾上皮细胞 (MDCK) 与人肺腺癌细胞 (A549) 增殖影响的曲线图)。

[0069] 图 2. 橙皮苷和山奈酚对 MAPK 蛋白家族成员 JNK, p38 及 ERK 的调控效果及对干扰素的调控效果 (图 2A. MAPK 家族 JNK, p38 及 ERK 蛋白抑制剂 (分别为 SP600125, SB203580 及 U0126) 对流感病毒复制, 干扰素 α , 干扰素 β 和干扰素 γ 表达的影响、图 2B. 山奈酚和橙皮苷对干扰素 α , 干扰素 β , 干扰素 γ 和 MAPK 家族蛋白表达的影响、图 2C. 山奈酚和橙皮苷对流感病毒 RNPs 出核的影响)。

[0070] 图 3. 以 MAPK 蛋白家族成员 JNK, p38 及 ERK 为靶标, 筛选潜在抗流感目标化合物

结果(图 3A. 大豆黄素、染料木素、柚皮素、柚皮苷二氢查尔酮、新橙皮苷二氢查尔酮、以及白羊黄素、香叶木素和淫羊藿苷对 MAPK 家族蛋白表达影响、图 3B. 大豆黄素、染料木素、柚皮素、柚皮苷二氢查尔酮、新橙皮苷二氢查尔酮、以及白羊黄素、香叶木素和淫羊藿苷对流感病毒复制的影响、图 3C. 大豆黄素、染料木素、柚皮素、柚皮苷二氢查尔酮、新橙皮苷二氢查尔酮、以及白羊黄素、香叶木素和淫羊藿苷结构式)。

具体实施方式

[0071] 细胞、病毒株、待筛选化合物

[0072] 1. 人肺上皮细胞(A549, 人肺腺癌细胞, 由上海细胞库提供) 培养于含 10% 胎牛血清(美国 PAA 公司)、青霉素和链霉素各 100U / ml 的 DMEM 培养基中(Gibico 公司), 5% CO₂、37°C (FIL-TER 型培养箱, 德国 Thermo 公司)。

[0073] 2. MDCK 细胞(犬肾上皮样细胞, 由中国医学科学院协和细胞中心购买) 培养于含 10% 胎牛血清(美国 PAA 公司)、青霉素和链霉素各 100U / ml 的 DMEM 培养基中(Gibico 公司), 5% CO₂、37°C (FIL-TER 型培养箱, 德国 Thermo 公司)。(MDCK, ATCC NO. CCL-34TM; A549, ATCC NO. CCL-185TM.)

[0074] 3. 流感病毒 A / WSN / 33 由中国科学院微生物研究所提供, 流感病毒 A / WSN / 33 可由 MDCK 细胞传代和培养。以 MOI=0.01 滴度流感病毒接种培养于 DMEM 补充 2% BSA 及 1ug / ml 胰酶培养基中的 MDCK 细胞, 2 小时后除去接种病毒并补充培养基, 继续培养 48 小时, 收集细胞上清, 存于 -80°C 备用。流感病毒 A / WSN / 33 最初是 1933 年在 Wisconsin 分离到的 A 型 H1N1 病毒, 普遍用于流感病毒科学研究, 由中国科学院微生物所提供。

[0075] 4. 大豆黄素、染料木素、橙皮苷、柚皮素、柚皮苷二氢查尔酮和新橙皮苷二氢查尔酮、白羊黄素、香叶木素、淫羊藿苷、山奈酚由山西惠科公司购买。

[0076] 5. 三个特异性抑制剂均购于 sigma 公司。

[0077] 6. 其他试剂或原材料如无特别说明, 为本领域常规试剂或原材料。

[0078] 实施例一、宿主细胞的病毒侵染和待筛选化合物的抗病毒效果

[0079] 1. 1. TCID₅₀ 法, 使用 TCID₅₀ 法检测橙皮苷或山奈酚抗流感病毒效果, 将 A549 细胞接种于 96 孔板(5000 细胞 / 孔), 将 100uM 橙皮苷加入培养基中, 并将流感病毒 A / WSN / 33 以 MOI=0.001 的病毒量接种于 96 孔板中, 孵育 48 小时后, 计算 TCID₅₀。结果见图 1A。可见, 橙皮苷在体外具有抗流感病毒感染作用, 而山奈酚在体外具有促进流感病毒感染作用。

[0080] 1. 2. 细胞病变效应检测, 将丰度 90% 的 A549 细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化后将细胞于 70% 丰度接种于 6 孔培养板, 细胞贴壁 24 小时后, 除去培养基, PBS (pH=7.0) 冲洗细胞一次, 加入 700u1 / 孔含有 0.5% BSA, 1ug / ml 胰酶的 DMEM 培养基, 并以 MOI=1 的 A / WSN / 33 病毒量于 37°C 孵育细胞 3 小时。除去培养基, PBS (pH = 7.0) 冲洗细胞一次, 分别加入含有终浓度为 100uM 橙皮苷或山奈酚的含有 0.5% BSA, 1ug / ml 胰酶的 DMEM 培养基, 37°C 继续孵育 24h 后, 拍照记录细胞病变效应, 结果如图 1B。该结果进一步证明了橙皮苷在体外具有抗流感病毒感染作用, 而山奈酚在体外具有促进流感病毒感染作用。

[0081] 1. 3. 对照实验, 将丰度 90% 的细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化后将细胞数调至 5x10⁴ / ml, 以 100u1 / 孔接种于 96 孔培养板, 细胞贴壁过夜后补充含不同浓度橙皮苷或山奈酚的培养基 100u1 / 孔, 每个浓度 3 个复孔, 继续培养 48 小时后, 除去培养基, 以 100u1 /

孔含 0.5mg / ml MTT(dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, sigma 公司)的磷酸盐缓冲液(PBS),培养 4 小时后除去 MTT,加入二甲基亚砜 100ul / 孔,在酶标仪 590nm 测吸光度(MK3 型,德国 Thermo 公司)。以对照孔(不含橙皮苷或山奈酚)的吸光度为 100%,药物孔与对照孔间的吸光度比值为细胞存活的百分率,做细胞存活曲线观察橙皮苷或山奈酚对 A549 细胞增殖的影响,结果见图 1C。可见,橙皮苷或山奈酚对 A549 细胞增殖没有显著影响。

[0082] 实施例二、橙皮苷或山奈酚对 MAPK 家族介导的宿主细胞自体防御功能的调节效果

[0083] 2.1. 阳性对照试验,

[0084] A549 细胞于 70% 丰度接种于 6 孔培养板,细胞贴壁 24 小时后,除去培养基, PBS(pH=7.0) 冲洗细胞一次,加入 700ul / 孔含有 0.5% BSA, 1ug / ml 胰酶的 DMEM 培养基,并以 MOI=1 的 A / WSN / 33 病毒量于 37°C 孵育细胞 3 小时。流感病毒孵育后,分别加入含 10uM p38 特异性抑制剂 SB203580 或 JNK 特异性抑制剂 SP600125,或 10uM ERK 特异性抑制剂 U0126 的含有 0.5% BSA, 1ug/ml 胰酶的 DMEM 培养基,37°C 继续孵育 24h 后,结果显示,对 P38 和 JNK 的抑制,能够显著的增强病毒 RNA 的表达量,对干扰素 α , β 和 γ 的表达量显著下调,而对 ERK 的抑制,则显著的抑制了病毒 NP 蛋白的出核,具体结果见图 2A,上述阳性对照试验表明,P38、JNK 蛋白能够正调控细胞自体防御,而 ERK 蛋白对细胞自体防御起负调控作用。

[0085] 2.2. 橙皮苷或山奈酚对 P38、JNK 蛋白的调控作用,

[0086] A549 细胞于 70% 丰度接种于 6 孔培养板,细胞贴壁 24 小时后,除去培养基, PBS(pH=7.0) 冲洗细胞一次,加入 700ul / 孔含有 0.5% BSA, 1ug / ml 胰酶的 DMEM 培养基,并以 MOI=1 的 A / WSN / 33 病毒量于 37°C 孵育细胞 3 小时。除去培养基, PBS(pH=7.0) 冲洗细胞一次,加入含有终浓度为 100uM 橙皮苷或山奈酚的含有 0.5% BSA, 1ug/ml 胰酶的 DMEM 培养基,37°C 继续孵育 24h 后,使用 TRizol 法提取细胞总 RNA 并反转录得到 cDNA,用于检测橙皮苷或山奈酚对干扰素 α , 干扰素 β 和干扰素 γ 表达水平的影响,实验结果见图 2B。

[0087] 同时,使用变性蛋白裂解液 NP40,提取细胞总蛋白,用于检测橙皮苷或山奈酚对 p38 和 JNK 蛋白表达水平及磷酸化水平的影响,实验结果见图 2B。

[0088] 结果:橙皮苷升高 p38 和 JNK 蛋白表达水平及磷酸化水平,促进干扰素 β 和干扰素 γ 表达水平,而山奈酚降低 p38 和 JNK 蛋白表达水平及磷酸化水平,抑制干扰素 β 和干扰素 γ 表达水平。

[0089] 2.3. 橙皮苷或山奈酚对 ERK 蛋白的调控作用,

[0090] 除去培养基, PBS(pH=7.0) 冲洗细胞一次,加入含有终浓度为 100uM 橙皮苷或 100uM 山奈酚的含有 0.5% BSA, 1ug / ml 胰酶的 DMEM 培养基,37°C 继续孵育 24h 后,5% BSA 于 37°C 孵育细胞 30 分钟, PBS(pH=7.0) 清洗细胞,使用流感病毒 NP 及 M1 蛋白抗体(1 : 500) 于 37°C 孵育细胞 1 小时, PBS(pH=7.0) 清洗细胞,使用绿色荧光标记二抗(1 : 1000) 于 37°C 孵育细胞 1 小时, PBS(pH=7.0) 清洗细胞,使用 choest(1 : 2000) 染色细胞核,使用激光共聚焦显微镜观察,实验结果见图 2C。

[0091] 结果:橙皮苷抑制流感病毒 RNPs 出核,并改变 M1 定位于细胞核周围,同时,橙皮苷

降低流感病毒 NP 和 M1 蛋白表达水平。山奈酚促进流感病毒 RNPs 出核,同时,提升流感病毒 NP 和 M1 蛋白表达水平。

[0092] 核糖核蛋白颗粒 (ribonucleoprotein particles, RNPs) 主要由病毒基因组 RNA (vRNA),核蛋白 (NP),和三个多聚酶蛋白 (PB1, PB2 和 PA) 组成,RNPs 被一层基质蛋白 (M1) 所环绕,然后是含有病毒主要抗原的膜结构,构成完整的流感病毒粒子。ERK 蛋白对流感病毒 RNPs 出核具有正调控作用,并影响 M1 在细胞核周围的定位。降低的 ERK 蛋白表达抑制流感病毒 RNPs 出核和 M1 定位,抑制流感病毒复制。上述结果表明,与实施例一的数据相对应,橙皮苷或山奈酚对流感病毒复制和扩散具有相反的调节作用,不同的宿主细胞自体防御机制是通过选择性调节 MAPK 家族的 P38、JNK、ERK 蛋白介导完成,可以使用 MAPK 家族蛋白作为筛选抗流感病毒的药物的靶标。

[0093] 实施例三、以 P38、JNK、ERK 蛋白为靶标,筛选其他目标化合物的抗流感病毒活性

[0094] 以橙皮苷或山奈酚为基础,进一步筛选具有和其相似母核结构的黄酮类小分子化合物对 MAPK 家族靶蛋白的影响,探讨其对细胞自体防御机制介导的抗流感病毒的效果,选取如下化合物:大豆黄素、染料木素、柚皮素、柚皮苷二氢查尔酮、新橙皮苷二氢查尔酮、以及白羊黄素、香叶木素和淫羊藿苷。

[0095] 3.1. 上述八种化合物对 p38 和 JNK 蛋白表达水平以及 ERK 蛋白的表达的调节效果,

[0096] A54 细胞于 70%丰度接种于 96 孔培养板,分别加入含有 100uM 的白羊黄素、香叶木素、淫羊藿苷、山奈酚、大豆黄素、染料木素、橙皮苷、柚皮素、柚皮苷二氢查尔酮和新橙皮苷二氢查尔酮的培养基并十倍稀释 A / WSN / 33 病毒 MOI=1 加入细胞中,孵育 48 小时后,检测 MAPK 家族蛋白的表达量,结果见图 3A

[0097] 结果显示,大豆黄素、染料木素、柚皮素、柚皮苷二氢查尔酮、新橙皮苷二氢查尔酮对 P38、JNK 蛋白的表达有促进作用、对 ERK 蛋白的表达有抑制效果;白羊黄素、香叶木素和淫羊藿苷则相反。

[0098] 3.2 上述八种化合物对流感病毒增殖影响

[0099] A54 细胞于 70%丰度接种于 96 孔培养板,分别加入含有 100uM 的白羊黄素、香叶木素、淫羊藿苷、山奈酚、大豆黄素、染料木素、橙皮苷、柚皮素、柚皮苷二氢查尔酮和新橙皮苷二氢查尔酮的培养基并十倍稀释 A / WSN / 33 病毒 MOI=0.001 加入细胞中,孵育 48 小时后,计算半数致死量 (TCID₅₀),实验结果见图 3B。

[0100] 结果:大豆黄素、染料木素、柚皮素、柚皮苷二氢查尔酮和新橙皮苷二氢查尔酮都具有不同程度的抗流感病毒作用,白羊黄素、香叶木素、淫羊藿苷都具有不同程度的促进流感病毒复制作用。

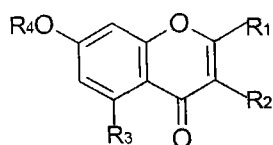
[0101] 3.3 筛选结果分析

[0102] 大豆黄素、染料木素、柚皮素、柚皮苷二氢查尔酮、新橙皮苷二氢查尔酮、白羊黄素、香叶木素、淫羊藿苷的分子结构见图 3C。

[0103] 根据上述规律,

[0104] 当黄酮类小分子化合物以下述母核结构为基础时,

[0105]

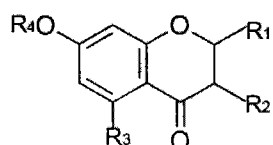


[0106] (1). 当 R1 为 H, R2 为苯基、邻甲氧苯酚基、对苯甲醚基、邻二苯甲醚基、对苯酚基、多元环糖及其寡聚物取代基, R3 为羟基或 H 时, R4 为 H 时, 如大豆黄素和染料木素, 具有抑制流感病毒复制作用;

[0107] (2). 当 R1 为苯基、邻甲氧苯酚基、对苯甲醚基、邻二苯甲醚基、对苯酚基取代基, R2 为 H 或 OR4 时, R3 为羟基时, R4 为 H 或多元环糖或其寡聚物时, 如白杨黄素、香叶木素, 淫羊藿苷和山奈酚, 具有促进流感病毒复制作用。

[0108] 当黄酮类小分子化合物以下述母核结构为基础时,

[0109]



[0110] 当 R1 为苯基、邻甲氧苯酚基、对苯甲醚基、邻二苯甲醚基、对苯酚基取代基, R2 为 H, R3 为羟基, R4 为 H 或多元环糖或其寡聚物取代基时, 如柚皮素和橙皮苷, 具有抑制流感病毒复制作用。

[0111] 最后, 需要说明的是, 上述实施例仅用于帮助本领域技术人员理解本发明的实质, 并不解释为对本发明实际保护范围的限制。

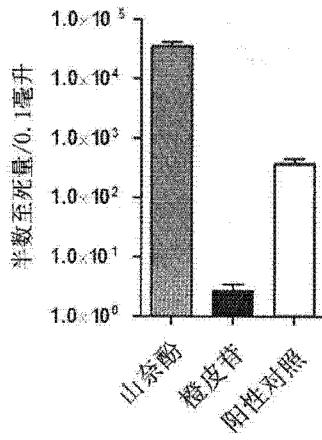


图 1A

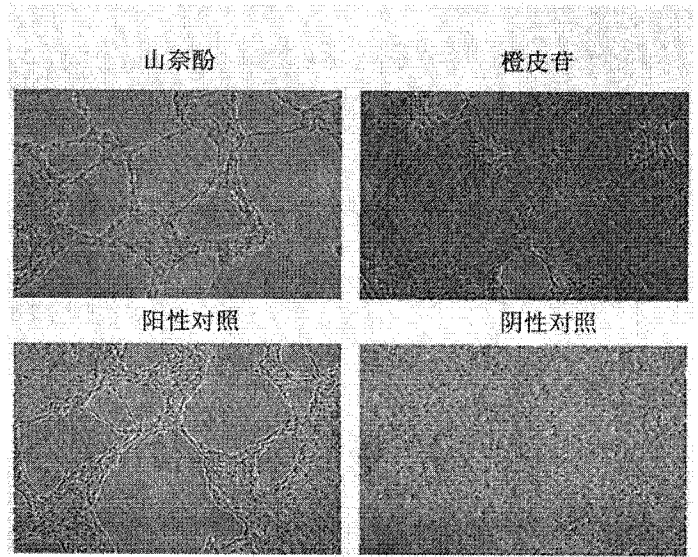


图 1B

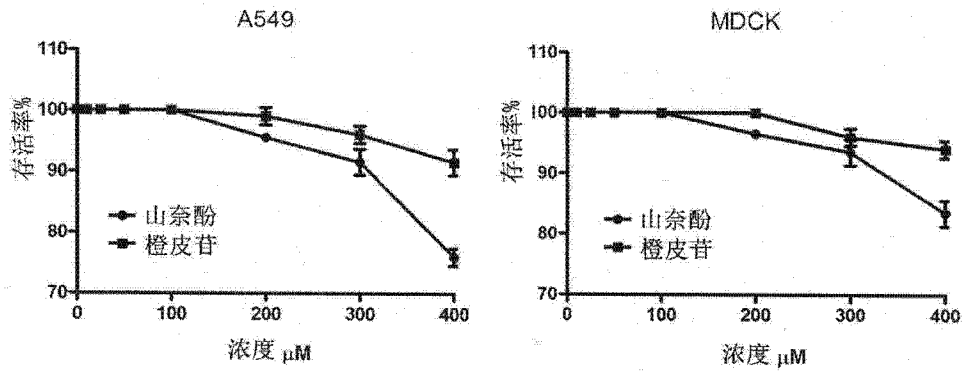


图 1C

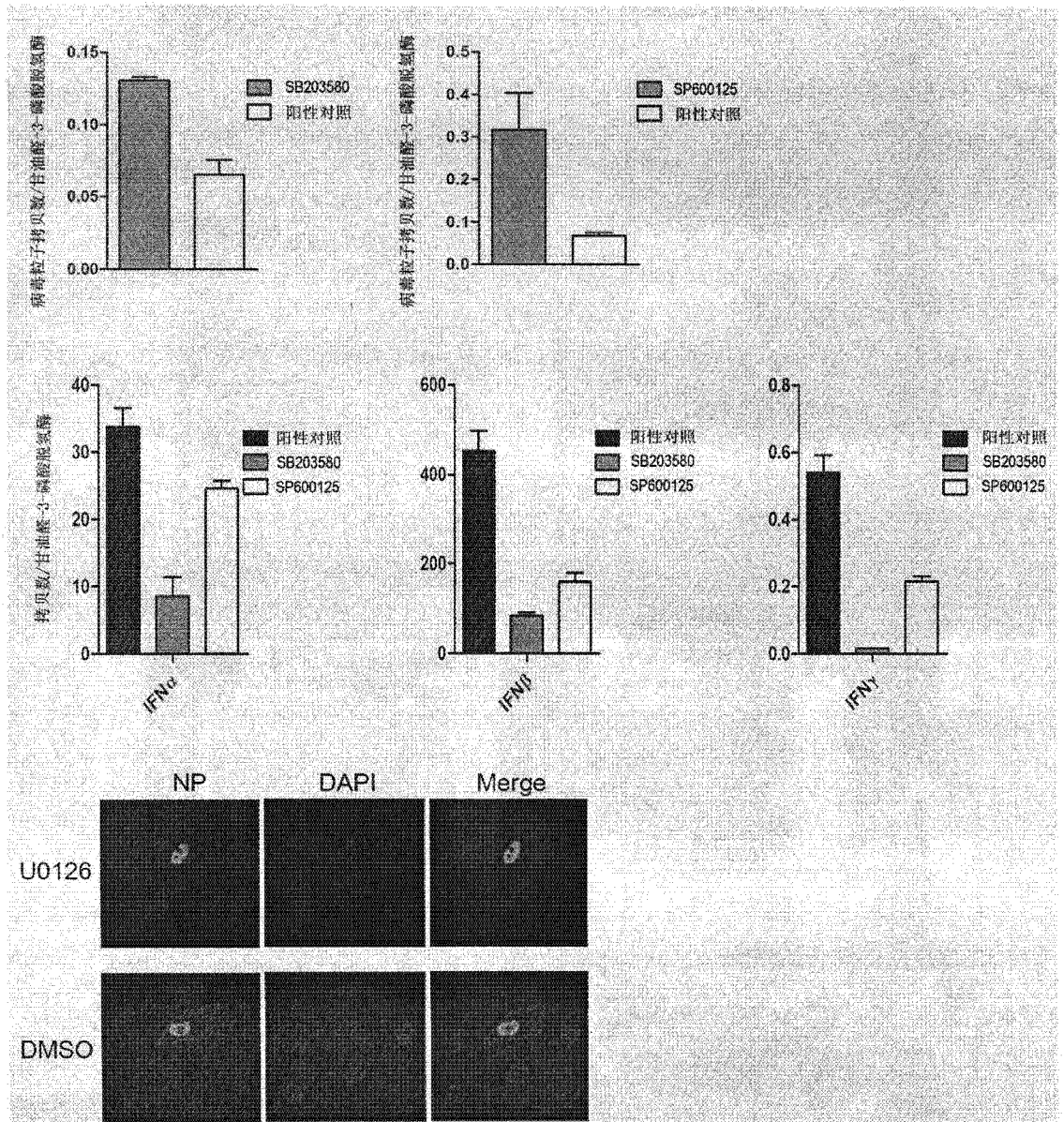


图 2A

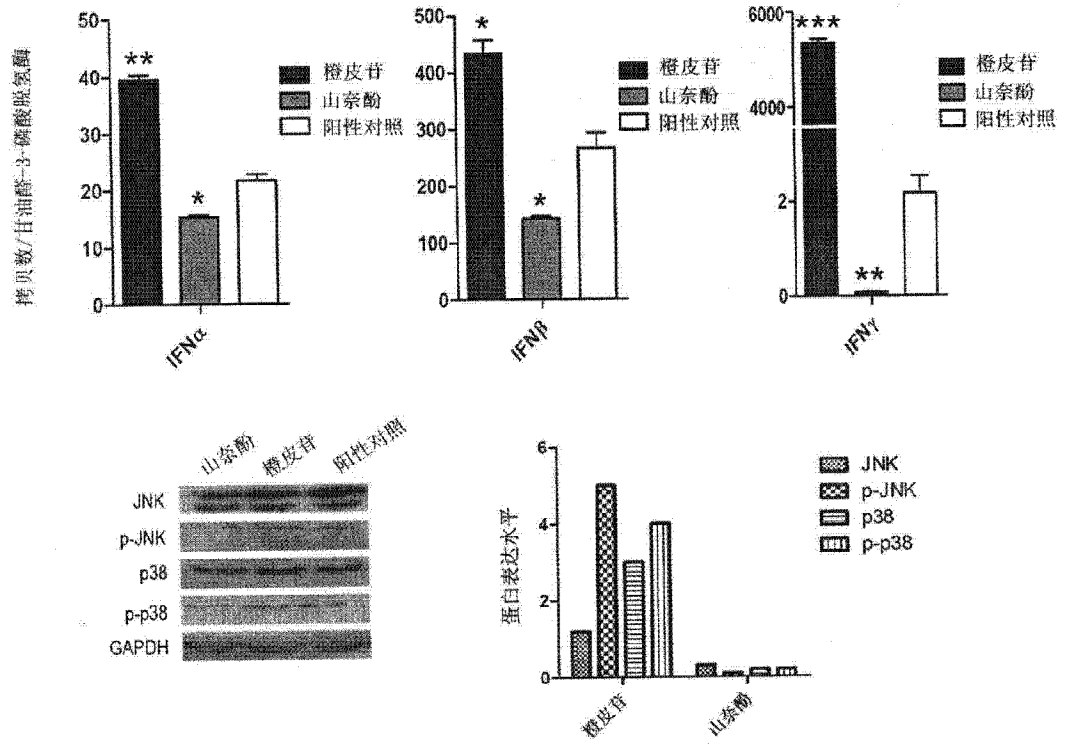


图 2B

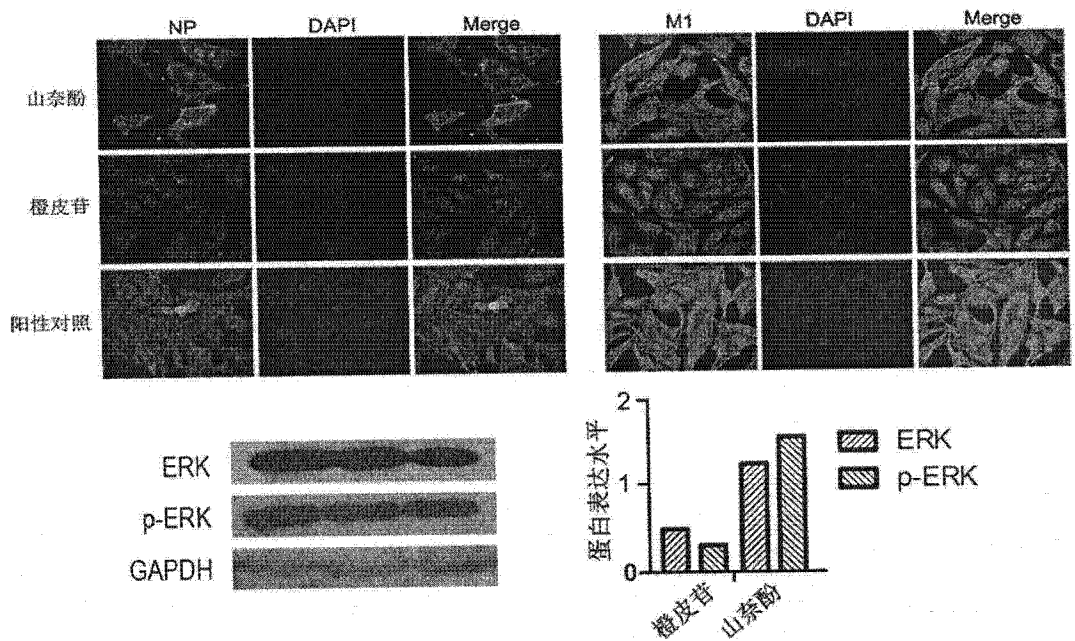


图 2C

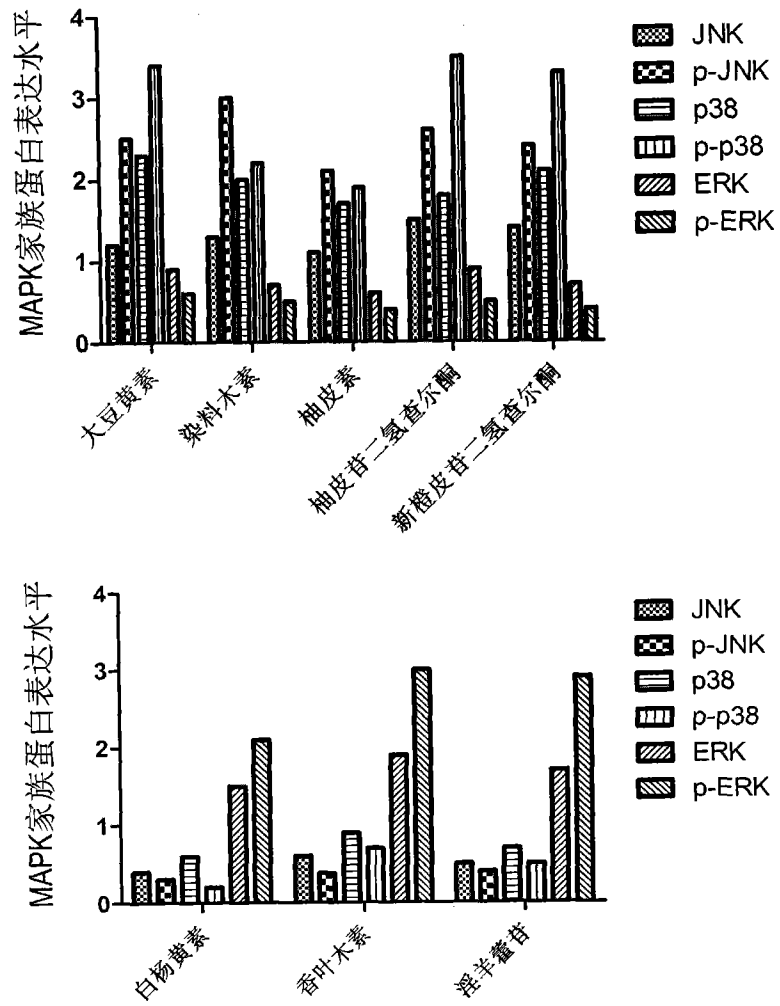


图 3A

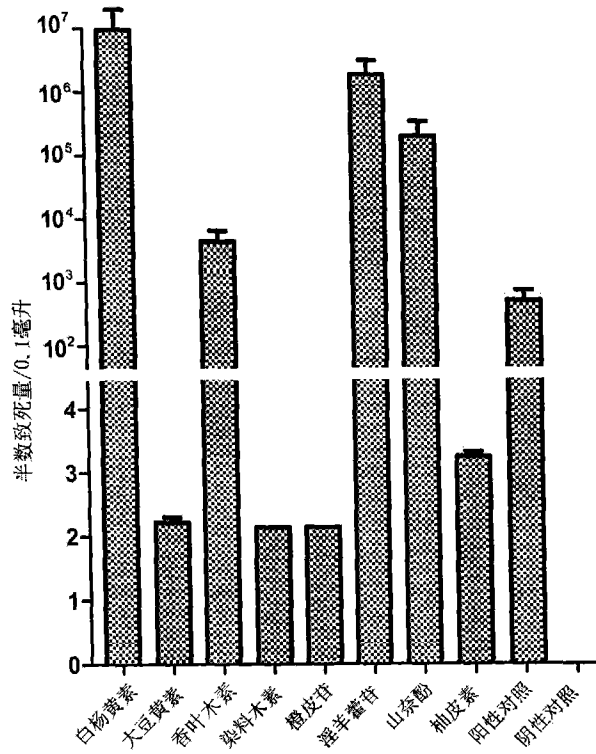
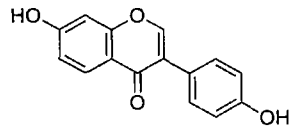
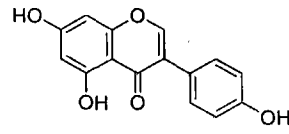


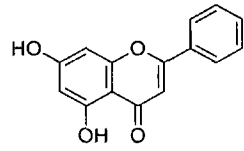
图 3B



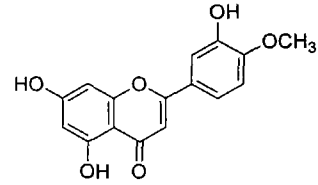
大豆黄素



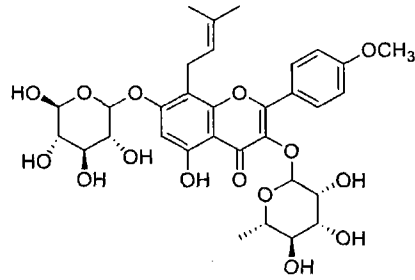
染料木素



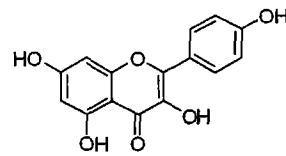
白杨黄素



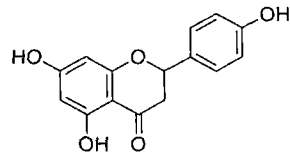
香叶木素



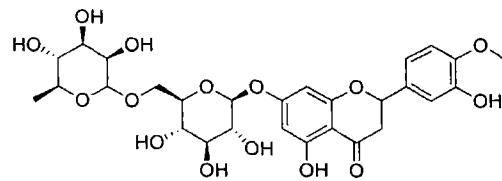
淫羊藿苷



山奈酚



柚皮素



橙皮苷

图 3C